

10/590785

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003135

International filing date: 25 February 2005 (25.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-051184
Filing date: 26 February 2004 (26.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 21 April 2005 (21.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

28.02.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2004年 2月26日

出 願 番 号
Application Number: 特願2004-051184

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

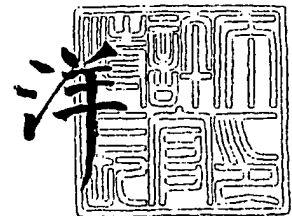
J P 2004-051184

出 願 人
Applicant(s): デンカ生研株式会社

2005年 4月 7日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特2005-303074(

【書類名】 特許願
【整理番号】 03890
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 G01N 33/53
【発明者】
 【住所又は居所】 新潟県五泉市大字木越字鏡田 1359-1 デンカ生研株式会社
 鏡田工場内
 【氏名】 皆川 康紀
【発明者】
 【住所又は居所】 新潟県五泉市大字木越字鏡田 1359-1 デンカ生研株式会社
 鏡田工場内
 【氏名】 斎藤 美千恵
【発明者】
 【住所又は居所】 新潟県五泉市大字木越字鏡田 1359-1 デンカ生研株式会社
 鏡田工場内
 【氏名】 松井 寛史
【特許出願人】
 【識別番号】 591125371
 【氏名又は名称】 デンカ生研株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100088546
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 谷川 英次郎
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 053235
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

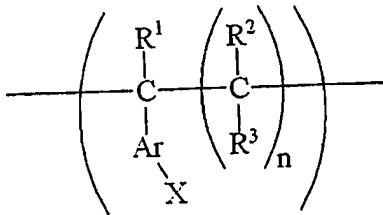
【請求項 1】

イオン性官能基を有する疎水性環式モノマーが重合されたポリマーであって、分子量が 1000 ないし 10 万であるイオン性界面活性剤から成る、妨害物質による測定値低下を抑制するための免疫測定法用測定値低下抑制剤。

【請求項 2】

前記繰返し単位が、下記一般式 [I] で表される請求項 1 記載の測定値低下抑制剤。

【化 1】



【I】

(ただし、Ar は疎水性環、X はイオン性官能基、R¹ ないし R³ は互いに独立に水素原子又はアルキル基を示し、n は 0 ないし 10 の整数を示し、Ar を構成する各炭素原子に結合している水素原子は、本発明の効果を阻害しない置換基で置換されていてもよい)。

【請求項 3】

前記疎水性環式モノマーが、芳香族モノマーである請求項 1 又は 2 記載の測定値低下抑制剤。

【請求項 4】

前記芳香族モノマーがベンゼン環を含有する請求項 3 記載の測定値低下抑制剤。

【請求項 5】

前記イオン性官能基がスルホン基若しくはその塩、カルボン酸若しくはその塩又はアミンである請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の測定値低下抑制剤。

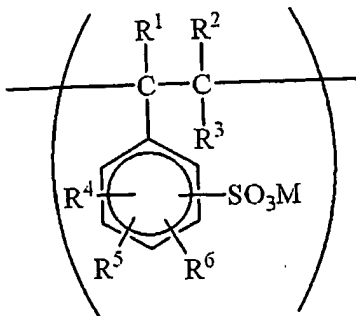
【請求項 6】

前記イオン性官能基がスルホン基又はその塩である請求項 5 記載の測定値低下抑制剤。

【請求項 7】

前記繰返し単位が、下記一般式 [II] で表される請求項 2 記載の測定値低下抑制剤。

【化 2】



【II】

(ただし、M は水溶液中で 1 価の陽イオンとなる原子又は基、R¹ ないし R³ は、上記一般式 [I] における R¹ ないし R³ と同義、R⁴ ないし R⁶ は互いに独立に、水素原子、低級アルコキシル基又は低級アルキル基を示す)

【請求項 8】

前記繰返し単位が、アネトールスルホン酸塩又はスチレンスルホン酸塩である請求項 5 記載の測定値低下抑制剤。

【請求項 9】

前記免疫測定法が免疫凝集法である請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項に記載の測定値低下抑制剤。

【請求項 10】

請求項 1 ないし 9 のいずれか 1 項に記載の測定値低下抑制剤の存在下において行なう免疫測定法。

【請求項 11】

被検試料を前記測定値低下抑制剤と接触させる第 1 工程と、次いで、第 1 工程後の被検試料を感作粒子又は抗血清と抗原抗体反応させる第 2 工程とを含む請求項 10 記載の免疫測定法。

【請求項 12】

被検試料が、生体試料である請求項 10 又は 11 記載の免疫測定法。

【請求項 13】

被検試料が、血液、血清又は血漿である請求項 12 記載の免疫測定法。

【請求項 14】

反応溶液中の前記測定値低下抑制剤の濃度が 0.01% ないし 5% (重量/容量) である請求項 10 ないし 13 のいずれか 1 項に記載の免疫測定法。

【請求項 15】

免疫凝集法である請求項 10 ないし 14 のいずれか 1 項に記載の免疫測定法。

【請求項 16】

緩衝液と、感作粒子又は抗血清を少なくとも含む免疫測定法用試薬において、請求項 1 ないし 9 のいずれか 1 項に記載の測定値低下抑制剤を含むことを特徴とする、免疫測定法用試薬。

【請求項 17】

前記免疫測定法用試薬は、緩衝液を少なくとも含み、被検試料と先に混合される第 1 試薬と、緩衝液及び感作粒子を少なくとも含み、被検試料と第 1 試薬の混合物に添加される第 2 試薬とから成る 2 液系試薬であり、前記測定値低下抑制剤は、前記第 1 試薬中に含まれる請求項 14 記載の試薬。

【請求項 18】

前記免疫測定法が免疫凝集法である請求項 16 又は 17 記載の試薬。

【書類名】明細書**【発明の名称】**免疫測定法用測定値低下抑制剤及びそれを用いた免疫測定法**【技術分野】****【0001】**

本発明は、妨害物質による測定値低下を抑制するための免疫測定法用測定値低下抑制剤並びにそれを用いた免疫測定法及び免疫測定法用試薬に関する。

【背景技術】**【0002】**

臨床検査において、生体試料を被検試料とする検査項目は多数存在する。その中の免疫学的測定法においては、目的物質の免疫反応に影響を与える妨害物質が生体試料中に存在することが知られている。この影響とは測定値の正確性に影響するものであり、いくつかの報告もなされている。

【0003】

これら妨害物質による影響の確認及び低減の最も一般的な方法として、被検試料を前希釈することにより妨害物質の濃度を低下させる方法がある。しかしこの方法の場合、希釈操作により妨害物質と共に目的物質濃度も低下するため、試料中の低濃度物質を検出する測定系では利用が困難となる。更に、希釈操作が加わることにより測定時間も延長し、迅速性に欠けるものとなる。一方で、妨害物質が既知の場合は妨害活性を抑制又は抑止する機能を持つ化合物の添加や加温などの前処理方法がとられるが、既知の特定物質だけに有効であり、測定項目によっては未知の物質が測定に悪影響を与える可能性も考えられる。

【0004】

また、特開平9-304384号公報では免疫測定法における偽陽性回避のため、スルホン酸基やその塩を含有する共役ジエン系重合体を用いることが記載されているが、特殊な試料中に存在する偽陽性物質よりも、全ての生体試料中に存在しうる妨害物質の回避が正確性向上に必要である。

【特許文献1】特開平9-304384号公報

【発明の開示】**【発明が解決しようとする課題】****【0005】**

本発明の目的は、被検試料中の妨害物質による影響を抑制して免疫測定法の正確性を向上させることができる、免疫測定法用測定値低下抑制剤並びにそれを用いた、妨害物質による測定値低下が抑制された免疫測定法及び免疫測定法用試薬を提供することである。

【課題を解決するための手段】**【0006】**

本願発明者らは、鋭意研究の結果、イオン性官能基を有する疎水性環式モノマーが重合されたポリマーであって、分子量が1000ないし10万であるイオン性界面活性剤を免疫測定法を行なう反応溶液に共存させることにより、被検試料中の妨害物質による影響を抑制して免疫測定法の正確性を向上させることができることを見出し、本発明を完成した。

【0007】

すなわち、本発明は、イオン性官能基を有する疎水性環式モノマーが重合されたポリマーであって、分子量が1000ないし10万であるイオン性界面活性剤から成る、妨害物質による測定値低下を抑制するための免疫測定法用測定値低下抑制剤を提供する。また、本発明は、上記本発明の測定値低下抑制剤の存在下において行なう免疫測定法を提供する。さらに、本発明は、緩衝液と、感作粒子又は抗血清とを少なくとも含む免疫測定法用試薬において、上記本発明の測定値低下抑制剤を含むことを特徴とする、免疫測定法用試薬を提供する。

【発明の効果】**【0008】**

本発明の免疫測定法の測定値低下抑制剤の存在下において免疫測定法を行なうことによ

り、被検試料中の妨害物質の影響が低減され、測定値低下抑制剤の非存在下において行なう場合よりも免疫測定法の正確性が向上する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

免疫測定法のうち、免疫凝集法は、抗原抗体反応により生じる、反応液の濁度や吸光度のような光学的性質の変化に基づいて、被検試料中の抗原又は抗体を検出又は定量する方法であり、免疫比濁法及び免疫比ろう法（ネフェロメトリー）が包含される。測定の感度を高めるため、通常、被検試料中の目的抗原又は目的抗体と抗原抗体反応する抗体又は抗原が、ラテックス粒子のような粒子上に不動化されており（感作粒子）、抗原抗体反応により該感作粒子が凝集することに起因する光学的性質の変化に基づいて被検物質の検出又は定量が行なわれる（ラテックス粒子を用いる場合は特にラテックス凝集法とも呼ばれる）。もっとも、感作粒子を用いることなく抗血清もしくはば用いられる。

【0010】

本発明の免疫測定法の測定値低下抑制剤は、イオン性官能基を有する疎水性環式モノマーが重合されたポリマーであって、分子量が1000ないし10万であるイオン性界面活性剤から成る。

【0011】

イオン性官能基としては、スルホン基若しくはその塩、カルボン酸若しくはその塩又はアミン（水溶液中でイオン化される第4級アミン等）が好ましく、特にスルホン基又はその塩が好ましい。このように、イオン性界面活性剤は、陰イオン界面活性剤でも陽イオン界面活性剤でもよい。

【0012】

また、疎水性環としては、芳香環やシクロアルキル環が挙げられ、酸素原子、窒素原子又はイオウ原子等を含む複素環であってもよいし、それらが縮合した縮合環であってもよい。疎水性環としては芳香環が好ましく、芳香環としては、ベンゼン環、ナフタレン環、アントラセン環等が例示され、好ましくはベンゼン環又はナフタレン環、さらに好ましくはベンゼン環である。

【0013】

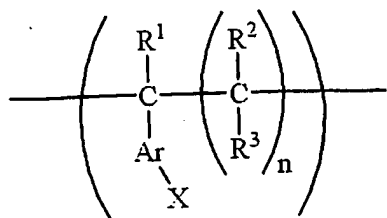
測定値低下抑制剤として用いられる好ましいポリマーとして、ポリアネトールスルホン酸ナトリウム塩、ポリスチレンスルホン酸ナトリウム塩、ナフタレンスルホン酸ホルマリン縮合物のナトリウム塩、芳香族スルホン酸ホルマリン縮合物のナトリウム塩（具体的には、デイスロール（商品名、日本乳化剤社製）、デモール（商品名、花王社製）、ポリテイPS-1900（ライオン）、ポリティN-100K（商品名、ライオン社製）等）を挙げることができる。

【0014】

また、測定値低下抑制剤として用いられる好ましいポリマーとして、繰返し単位が、下記一般式[I]で表されるものを挙げることができる。

【0015】

【化1】



【I】

【0016】

（ただし、Arは疎水性環、Xはイオン性官能基、 R^1 ないし R^3 は互いに独立に水素原子又は

アルキル基を示し、 n は0ないし10の整数を示し、Arを構成する各炭素原子に結合している水素原子は、本発明の効果を阻害しない置換基で置換されていてもよい。

【0017】

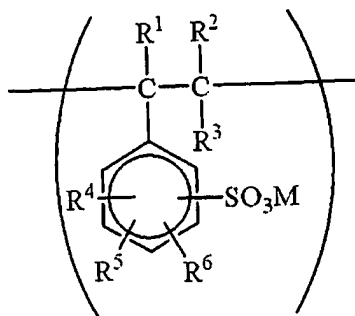
上記一般式[I]において、X及びArは、それぞれ上記したイオン性官能基及び疎水性環である。 R^1 ないし R^3 がアルキル基の場合、低級（炭素数1～4、以下同じ）アルキル基が好ましい。また、 n は0ないし3が好ましい。また、Arを構成する各炭素原子に結合している水素原子は、本発明の効果を阻害しない置換基で置換されていてもよく、このような置換基の例として、低級アルキル基及び低級アルコキシル基を挙げることができる。

【0018】

一般式[I]で表される繰返し単位のうち、下記一般式[II]で表されるものが好ましい。

【0019】

【化2】



[II]

【0020】

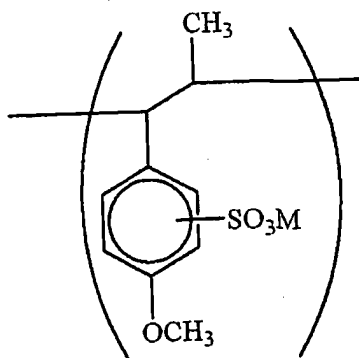
式[II]中、Mは、水溶液中で1価の陽イオンとなる原子又は基、好ましくはナトリウムやカリウムのようなアルカリ金属、 R^1 ないし R^3 は、互いに独立に水素原子又は低級アルコキシル基、 R^4 ないし R^6 は、互いに独立に水素原子又は低級アルキル基を示す。

【0021】

上記一般式[I]で表される繰返し単位のうち、特に好ましいものとして、下記式[III]で表されるアネートルスルホン酸塩、下記式[IV]で表されるスチレンスルホン酸塩及び下記式[V]で表されるナフタレン酸スルホン酸ホルマリン縮合物塩を挙げることができる。

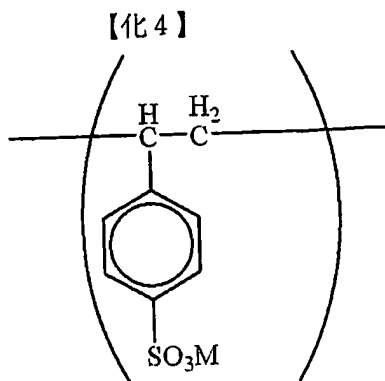
【0022】

【化3】

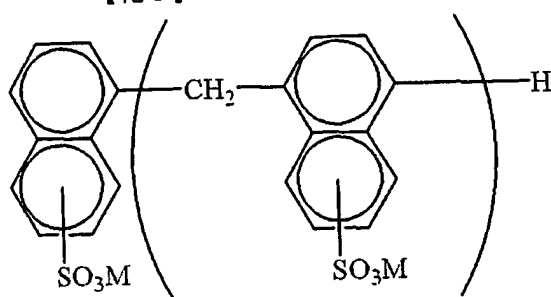


[III]

【0023】



【0024】
【化5】



【V】

【0025】

ただし、式【III】、【IV】及び【V】中、Mは式【I】と同義であり、好ましくはナトリウムやカリウムのようなアルカリ金属である。

【0026】

上記ポリマーの分子量は、1000～10万であり、好ましくは、1000～6万である。

【0027】

上記繰返し単位は、1種のみでも2種以上を組み合わせて採用することもできる。測定値低下抑制剤として用いられるポリマーは、上記繰返し単位のみから成ることが好ましいが、本発明の効果に悪影響を与えない範囲で他の単位を含んでもよい。通常、このような他の単位のポリマー中の含量は、20モル%以下、好ましくは10モル%以下、さらに好ましくは5モル%以下である。

【0028】

本発明の免疫測定法は、上記した本発明の測定値低下抑制剤の存在下において免疫測定法を行なうものである。測定値低下抑制剤の使用量は、特に限定されないが、通常、反応溶液中の最終濃度が0.01%ないし5%（重量/容量）であり、好ましくは0.1～1%程度である。もっとも、使用する高分子イオン性界面活性剤の種類、被検試料と緩衝液および抗血清液または、感作ラテックス粒子の混合比などにより効果が得られる最適な濃度を選択することが好ましい。

【0029】

本発明の免疫測定法に付される被検試料は、特に限定されないが、妨害物質の影響を抑制するという本発明の効果を大いに発揮できる生体試料が好ましく、特に、血液、血清、血漿、尿、便、唾液、組織液、髄液、ぬぐい液等の体液等又はその希釈物が好ましく、さらには血液、血清及び血漿又はこれらの希釈物が好ましい。

【0030】

免疫測定法が免疫凝集法である場合に用いられる感作粒子に感作される抗体又は抗原は

特に限定されるものではなく、従来と同様、例えば、C-反応性蛋白 (CRP)、リウマトイド因子 (RF)、フェリチン (FER) 及びミオグロビン (Mb) 並びにこれらに対する抗体を例示することができるが、もちろんこれらに限定されるものではない。

【0031】

上記測定値低下抑制剤の存在下において免疫測定法を行なうことを除き、本発明の免疫測定法は従来と同様に行なうことができる。すなわち、免疫測定法が免疫凝集法である場合、反応液中の感作粒子の濃度は、特に限定されないが、通常、0.01～0.5%程度であり、反応は、通常、1℃～56℃、好ましくは37℃で1分間～10分間程度行なわれる。もっとも、反応条件はこれらに限定されるものではない。また、反応媒体としては、通常、グリシン緩衝液等の各種緩衝液が用いられる。反応溶液の濁度又は吸光度を反応の開始前と開始後一定時間後測定し、又は、反応の開始前及び開始後経時的に測定し、濁度若しくは吸光度の変化の大きさ (エンドポイント法) 又は変化の速度 (レート法) に基づき、被検物質の検出又は定量を行なう。なお、免疫凝集法は、手動により行なうこともできるし、自動分析装置を用いて行うこともできる。

【0032】

免疫測定法が免疫凝集法である場合、本発明の方法では、測定値低下抑制剤と、感作粒子又は抗血清を同時に被検試料と混合しても良いが、被検試料を測定値低下抑制剤と接触させる第1工程と、次いで、第1工程後の被検試料を感作粒子又は抗血清と抗原抗体反応させる第2工程とを含むことが、本発明の効果を最大限に得る上で好ましい。この場合、第1工程、第2工程とも、特に限定されないが、反応時間はそれぞれ、通常1分間～10分間、好ましくは1分間～5分間、反応温度は通常、1℃～56℃、好ましくは37℃で行なわれる。また、2段階で反応を行なう場合、測定値低下抑制剤の濃度は、第1工程の反応液中、好ましくは0.01%ないし5% (重量/容量) であり、さらに好ましくは0.05～1%程度である。

【0033】

本発明の免疫測定法は、免疫凝集法に限定されるものではなく、サンドイッチELISA等のサンドイッチ法、イムノクロマト法、競合法等も含まれる。これらの免疫測定法の場合にも、本発明の測定値低下抑制剤を免疫反応の媒体中に含ませてそれぞれの免疫測定法を行なえばよい。その際の測定値低下抑制剤の濃度は上記と同様でよい。

【0034】

本発明は、また、緩衝液と、感作粒子と、上記測定値低下抑制剤を含む免疫測定法用試薬をも提供する。上記のように、免疫凝集法を2段階で反応を行なう場合には、免疫測定法用試薬は、緩衝液を少なくとも含み、被検試料と先に混合される第1試薬と、緩衝液及び感作粒子を少なくとも含み、被検試料と第1試薬の混合物に添加される第2試薬とから成る2液系試薬であることが操作性及び試薬の安定性の観点から好ましく、この場合、前記測定値低下抑制剤は、前記第1試薬中に含まれる。この場合、第1試薬中の測定値低下抑制剤の濃度は、特に限定されないが、通常、0.01～5% (w/v)、好ましくは、0.01～1% (w/v) 程度である。なお、これらの試薬の他に、希釈液を用いて被検試料を希釈してもよい。

【0035】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【実施例1】

【0036】

試薬

以下の組成からなるミオグロビン測定用ラテックス比濁用試薬を調製した。

第1試薬

170mM グリシン緩衝液 pH7.0
50mM EDTA
100mM 塩化ナトリウム

0.3% ポリアネトールスルホン酸ナトリウム塩 (分子量 4 万)

第 2 試薬

Mb-ラテックス「生研」/ラテックス浮遊液 (デンカ生研社製)

【実施例 2】

【0037】

試薬

以下の組成からなるミオグロビン測定用ラテックス比濁用試薬を調製した。

第 1 試薬

170mM グリシン緩衝液 pH7.0

50mM EDTA

100mM 塩化ナトリウム

0.3% ポリスチレンp-スルホン酸ナトリウム塩 (分子量 1 万 4 千)

第 2 試薬

Mb-ラテックス「生研」/ラテックス浮遊液 (デンカ生研社製)

【0038】

(比較例 1)

試薬

比較用試薬として第 1 試薬中にポリアネトールスルホン酸ナトリウム塩及びポリスチレンp-スルホン酸ナトリウム塩を含まない、以下の組成からなるミオグロビン測定用ラテックス比濁用試薬を調製した。

第 1 試薬

170mM グリシン緩衝液 pH7.0

50mM EDTA

100mM 塩化ナトリウム

第 2 試薬

Mb-ラテックス「生研」/ラテックス浮遊液 (デンカ生研社製)

【0039】

なお、実施例 1、実施例 2 及び比較例 1 の第 1 試薬、第 2 試薬で用いる緩衝液はリン酸緩衝液、グッド緩衝液等を使用することができ、pH についても緩衝液の好適な pH を使用できる。

【0040】

測定例

被検試料 無作為に抽出した臨床検体 1 例 (血清)

測定方法 試料調製 被検試料を、生理食塩液を希釈液として希釈濃度 1/10 (10 倍希釈) ~ 10/10 (希釈せず) の段階に希釈する。

測定方法 東芝 TBA-30R 型自動分析装置による測定

【0041】

自動分析装置による測定

実施例 1、実施例 2 及び比較例 1 の各試薬を用いて測定を行った。前述の調製した試料 20 μ L に第 1 試薬 200 μ L を添加し、37℃ で攪拌混合し、5 分放置後、第 2 試薬 100 μ L を添加し、更に 37℃ で攪拌混合した後、約 2 分間の凝集反応を 570nm の吸光度変化量として測定した。またあらかじめ既知濃度の試料を同一条件で測定し、濃度と吸光度変化量の関係を表す検量線を作成しておいた。第一試薬中の測定値低下抑制剤の有無により、求めたそれぞれの測定値 (ng/mL) を比較した。

【0042】

結果を下記表 1 に示す。表 1 中、「理論値」は、各例における共存する妨害物質が引き起こす測定値低下作用を無視し得る希釈濃度 1/10 (10 倍希釈) の測定値を基準とし、これに希釈濃度の分子を乗じた値 (希釈濃度 10/10 なら 10 倍、2/10 なら 2 倍) を意味する。また、差 (%) は、(理論値 - 測定値) / 理論値 \times 100 (%) を意味し、差 (%) が小さいほど、理論値との乖離が小さいことを示す。

【0043】

表 1

希釈 濃度	比較例 1			実施例 1			実施例 2		
	測定値	理論値	差 (%)	測定値	理論値	差 (%)	測定値	理論値	差 (%)
1/10	53	53	0%	61	61	0%	53	53	0%
2/10	114	126	10%	121	122	1%	124	126	2%
3/10	152	189	20%	181	183	1%	186	189	2%
4/10	200	252	21%	238	244	2%	239	252	5%
5/10	233	315	26%	296	305	3%	299	315	5%
6/10	267	378	24%	354	366	3%	361	378	4%
7/10	316	441	28%	416	427	4%	422	441	4%
8/10	357	504	29%	471	488	3%	486	504	4%
9/10	398	567	30%	526	549	4%	542	567	4%
10/10	424	630	33%	581	610	5%	503	630	4%

(測定値、理論値単位: ng/ml)

【0044】

表 1 に示されるように、測定値低下抑制剤を含まない比較例 1 では、無希釈の試料（希釈濃度 10/10）で、理論値と測定値の差が 33 % にも達するのに対し、本発明の実施例 1 及び 2 では、無希釈の場合でも差は 5 % 又は 4 % であった。これらの結果は、本発明の測定値低下抑制剤の添加により理論値と測定値の差が小さくなることを示しており、妨害物質の影響が低減されることによって測定値の正確性が大幅に向上していることがわかる。

【書類名】要約書

【要約】

【課題】 被検試料中の妨害物質による影響を抑制して免疫比濁法の正確性を向上させることができる、免疫測定法用測定値低下抑制剤並びにそれを用いた、妨害物質による測定値低下が抑制された免疫測定法及び免疫測定法用試薬を提供すること。

【解決手段】 妨害物質による測定値低下を抑制するための免疫測定法用測定値低下抑制剤は、イオン性官能基を有する疎水性環式モノマーが重合されたポリマーであって、分子量が1000ないし10万であるイオン性界面活性剤から成る。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号

特願2004-051184

受付番号

50400311874

書類名

特許願

担当官

第一担当上席

0090

作成日

平成16年 2月27日

<認定情報・付加情報>

【提出日】

平成16年 2月26日

特願 2004-051184

出願人履歴情報

識別番号

[591125371]

1. 変更年月日

1997年 6月12日

[変更理由]

住所変更

住所

東京都中央区日本橋茅場町三丁目4番2号

氏名

デンカ生研株式会社